

網膜下腔への培養虹彩色素上皮細胞移植

著者	山田 桂
号	3071
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/21727

氏 名（本籍） やま だ かつら
山 田 桂

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 3 0 7 1 号

学位授与年月日 平 成 10 年 3 月 4 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 63 年 3 月 22 日
秋田大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 網膜下腔への培養虹彩色素上皮細胞移植

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 玉 井 信 教 授 藤 村 重 文

教 授 里 見 進

論文内容要旨

研究背景

色素上皮移植に用いる細胞としては、網膜色素上皮細胞 (RPE) を用いた自家移植が、拒絶反応を避けられる点で最も理想的であると考えられる。しかし自己の RPE を得るには、網膜に対する手術侵襲の大きな手術が必要となる。

一方、虹彩色素上皮細胞 (IPE) は神経外胚葉由来であり、色素細胞であることから、RPE に代わり得るドナー細胞と考えられ、眼科医にとり日常的な手技である周辺虹彩切除術で局所麻酔下に安全かつ容易に十分な量が得られる。

目的

IPE を用いて網膜変性症モデル動物である RCS ラットの網膜変性阻止が可能かどうか検討した。更に、IPE に bFGF-cDNA を導入し、その変性阻止効果について検討した。

方法

ドナー IPE は、12 時間の明暗周期で飼育した Long-Evans ラットより採取した。屠殺後直ちに眼球を摘出、実体顕微鏡下に IPE を分離し培養した。

こうして得られた IPE に対し、真核細胞に対し高発現能を持つ vector である pCXN2 に、ラット bFGF-cDNA を導入し用いた。

遺伝子導入 IPE から mRNA を抽出、ポリメラーゼ酵素連鎖反応 (PCR) を行った。vector のみを導入した IPE と、ラット bFGF-cDNA を導入した IPE とを比較し、後者において bFGF mRNA の発現が強いことを確認した。

レシビエントは網膜変性が始まる直前の生後 21 日の RCS ラットとした。手術は Li らの経強膜的移植方法を一部改変して応用し、IPE を $1\mu\text{l}$ 中 3 万個含む細胞浮遊液 $2\mu\text{l}$ を上部網膜周辺部の網膜下腔に移植した。ラット bFGF-cDNA を導入した IPE を移植した群 3 匹 3 眼、および遺伝子導入を行わない IPE を移植した群 3 匹 3 眼を作成した。

移植手術から 30 日後に眼球を摘出し光学顕微鏡下に観察した。

摘出眼球から実体顕微鏡下に網膜を分離し、移植部位、および移植部位から十分に離れた部位の組織を約 2mm^2 の範囲で切除し視細胞に特異的なマーカーとして transducin の mRNA を、PCR で検索した。

結 果

遺伝子導入を行わない IPE を移植した眼球の移植部位では外顆粒層が保たれ、外節が残存していた。これに対し、同じ眼球の視神経乳頭を越えた部位では網膜変性が生じ、外顆粒層はごく薄く存在するのみで外節は消失していた。

bFGF-cDNA を導入した IPE を移植した眼球の移植部位でも外顆粒層および外節が保たれていたのに対し、移植部位から離れた部位では網膜変性が生じ、外顆粒層はごく薄く存在するのみで外節は消失していた。

連続切片上で外顆粒層の厚みが最大となる部位で、外顆粒層および内顆粒層の厚みを計測し外顆粒層の厚みと内顆粒層の厚みとの比を計算すると、bFGF-cDNA を導入した IPE を移植したものでは 1.138、遺伝子導入を行わない IPE を移植したものでは 0.626 で、Wilcoxon 順位和検定にて両者の間には危険率 5 % で有意差が認められた。

β -actin mRNA の発現には、bFGF-cDNA を導入した IPE を移植したものと、遺伝子導入を行わない IPE を移植したものとは、発現の差はみられなかったが、transducin mRNA は bFGF-cDNA を導入した IPE を移植したもので強く発現していた。

考 按

IPE 移植と RPE 移植とでは組織像に差がなかったことから少なくとも移植後 1 ケ月の時点までは、IPE は RPE と同等の網膜変性阻止効果を有することが明らかとなった。

bFGF-cDNA を導入した IPE を移植した網膜では、遺伝子導入を行わない IPE を移植した網膜に比べ視細胞杆体がより良く保たれていることが示された。

結 論

RPE が障害される網膜色素変性症や加齢黄斑変性症は現在まで、決め手となる治療法が発見されていない。色素上皮移植が有効であるならば、その移植が自家移植であればなお理想的と言えよう。その場合移植に用いる細胞としては理想的と考えられる RPE を自己組織からいかに得るかが問題となる。今回、自家移植に用いる色素上皮細胞として IPE を取り上げ RCS ラットの網膜下腔へ移植し網膜変性阻止効果を確認した。また、高発現 vector である pCXN2 に、ラット bFGF-cDNA を導入し、これを培養 IPE に組み込むことができた。この IPE は in vitro において高いレベルで bFGF mRNA を発現し、RCS ラットの網膜下腔へ移植することにより視細胞変性が抑制されることが示された。移植された細胞が生存する間、常に導入された因子を放出し続けるかどうかは不明であり、今後さらに検討しなければならない。しかし将来、色素上皮移植が臨床応用されるときのことを考えれば、自家移植に用いる色素上皮細胞として、自己組織として入手が容易 IPE は大きな期待のもてるドナー細胞の一つであると思われた。

審 査 結 果 の 要 旨

網膜色素変性症は遺伝性疾患として失明にいたるもっとも重篤で、頻度の高い疾患である。現在もその根本的な治療法は見いだされておらず、厚生省の難病に指定され、その新しい治療法の開発に各国で努力がなされている。この疾患の本態は光受容器である視細胞杆体又は錐体が遺伝子異常によって変性脱落して行く為であり、主として光化学反応に関与する各種の蛋白又は酵素の異常であることが近年明らかにされた。

この疾患のモデル動物や視細胞変性の実験動物における変性阻止が各種の細胞増殖因子、サイトカインの投与によって得られることが近年明らかにされた。さらに、視細胞を栄養する役割を持つ、網膜色素上皮細胞がこれらのサイトカインを分泌していること、その機能不全が視細胞変性の原因の一つに考えられることが報告された。そのため新たな治療法の一つとして色素上皮移植が試みられようとしている。それは健常な色素上皮を移植することにより、直接、または間接に（サイトカインを介して）視細胞を変性、脱落から阻止することが動物実験で示唆されたからである。

本研究は網膜変性モデル動物である RCS ラットを用い、虹彩色素上皮を移植したときの視細胞変性阻止効果と、さらに培養虹彩色素上皮細胞に細胞増殖因子である bFGF の遺伝子を導入し、意図的にこのサイトカインを分泌させたときの効果と比較しようと試みた研究である。それはヒトに臨床応用しようと考えたとき、網膜色素上皮を患者自身から得ることは困難だが、虹彩は容易に得られる上に、発生学的に両者が神経外胚葉という共通の原器から分化しているためである。

その結果両者ともにモデル動物の視細胞変性を阻止することが明らかになった。審査においては、網膜下に見られる細胞が本当に移植した細胞であるか、その培養細胞の単一性等が問題になった。また実験期間が、まだ1カ月と言う短期間の上に、個体数も少なくどちらが有効と比較することは困難であるが、自然経過に比べ明らかに保持されており、その効果を証明している。しかしこの研究は臨床応用の前段階としては是非必要な研究であり、現段階までも博士論文として意義あるものであると考えられる。